



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b>  <b>C07H 1/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/07863</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1992 (14.05.92)</b>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/02017 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Oktober 1991 (24.10.91)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 34 036.8      26. Oktober 1990 (26.10.90)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Niederheider Straße 3, D-4000 Düsseldorf 13 (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-4006 Erkrath 2 (DE). COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstr. 5, D-4300 Essen-Kettwig (DE). FEUSER, Petra [DE/DE]; Belvedere-Str. 46, D-5000 Köln 41 (DE).</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(74) Anwälte:</b> WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></td></tr></table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/02017 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Oktober 1991 (24.10.91)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 34 036.8      26. Oktober 1990 (26.10.90)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Niederheider Straße 3, D-4000 Düsseldorf 13 (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-4006 Erkrath 2 (DE). COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstr. 5, D-4300 Essen-Kettwig (DE). FEUSER, Petra [DE/DE]; Belvedere-Str. 46, D-5000 Köln 41 (DE).	<b>(74) Anwälte:</b> WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/02017 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Oktober 1991 (24.10.91)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 34 036.8      26. Oktober 1990 (26.10.90)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Niederheider Straße 3, D-4000 Düsseldorf 13 (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-4006 Erkrath 2 (DE). COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstr. 5, D-4300 Essen-Kettwig (DE). FEUSER, Petra [DE/DE]; Belvedere-Str. 46, D-5000 Köln 41 (DE).	<b>(74) Anwälte:</b> WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>			
<b>(54) Title: DEVICE AND PROCESS FOR INSULATING NUCLEIC ACIDS FROM CELL SUSPENSIONS</b>  <b>(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS ZELLSUSPENSIONEN</b>  <b>(57) Abstract</b>  The description relates to a process for isolating nucleic acids by the lysis of intact cells and the removal of the nucleic acids from the lysed cells, in which: a) the cells are immobilised in a porous matrix, whereby the size of the hollows in the matrix is of the order of that of the type of cell to be lysed; b) the cells are lysed; c) the nucleic acids are fixed on the surface of the matrix; and then d) they are eluted. The description also relates to a device for implementing the process of the invention.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Es wird ein Verfahren beschrieben, zur Isolierung von Nukleinsäuren durch Lyse intakter Zellen und Entfernung der aus den lysierten Zellen ausgetretenen Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß a) die Zellen in einer porösen Matrix immobilisiert werden, wobei die Größe der Hohlräume der Matrix in der Größenordnung des zu lysierenden Zelltyps liegt, b) die Zellen lysiert werden, c) die Nukleinsäuren auf der Matrixoberfläche fixiert werden und danach d) eluiert werden. Es wird ebenfalls eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben.				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU <sup>+</sup>	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

<sup>+</sup> Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

5

"Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung  
von Nukleinsäuren aus Zellsuspensionen"

10

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch Lysis intakter Zellen und Entfernung der aus den lysierten Zellen ausgetretenen Nukleinsäuren sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

15

Die Reinigung von Nukleinsäuren spielt eine zentrale Rolle in der modernen Molekularbiologie. Nukleinsäuren dienen als Ausgangsmaterial für Genklonierungen und genetische Analysen in der labordiagnostischen Forschung und im routinemäßigen Einsatz. Zum Beispiel wird auf Nukleinsäurebasis die Analyse genetischer Erkrankungen von Blutzellen, Virus- und Bakterienanalytik aus Blut, Urin, Stuhl oder Sekreten durchgeführt. Der Analyse aus Vollblut kommt dabei besondere klinische Bedeutung zu.

25

Üblicherweise werden Nukleinsäuren aus Zellen gewonnen. Dabei werden Zellen beispielsweise unter stark denaturierenden und gegebenenfalls reduzierenden Bedingungen aufgeschlossen (Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, S., 30 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harborn). Weit verbreitet ist der Aufschluß der Zellen mit Detergenzien als denaturierende Reagenzien und die Verwendung von bestimmten Enzymen zum Abbau der Proteinstrukturen und nukleinsäurespaltenden Enzymen. So werden beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) und EDTA als denaturierende Agenzien

verwendet und Proteinase K. Das Ergebnis dieses Aufschlußverfahrens ist meistens eine hochviskose gallertartige Struktur, aus der die Nukleinsäuren mittels Phenol-extraktion isoliert werden. Die Nukleinsäuren bleiben  
5 dabei in großer Länge erhalten und werden nach Dialyse und Präzipitation aus der wässrigen Phase entfernt. Dieses Aufschlußverfahren ist gegenüber Nicht-Nukleinsäure-Strukturen so aggressiv, daß dem Verfahren auch Gewebestücke unterworfen werden können. Wegen der ar-  
10 beitsintensiven Technik mit mehrfachem Wechsel der Reaktionsgefäße ist diese Methode jedoch für große Probenaufkommen und Routinepräparationen ungünstig. Dieses Verfahren ist zwar automatisierbar, jedoch bewältigt eine handelsübliche Apparatur gegenwärtig etwa 8 Proben gleich-  
15 zeitig in vier Stunden (Applied Biosystems A 371). Das Verfahren ist somit teuer und eignet sich nicht für die Durchschleusung großer Probenserien. Weiterhin ist nachteilhaft, daß die Folgereaktionen, wie enzymatische Amplifikation, infolge der großen Längen der isolierten  
20 Nukleinsäuren gestört ist. Darüber hinaus sind die anfallenden Lösungen hochviskos und schwer handhabbar. Insbesondere DNA sehr großer Länge ist eher störend, da die mit dem Verfahren gemäß im Stand der Technik gewonnen Nukleinsäuren gesondert verkleinert werden müssen, um  
25 weiterverarbeitet werden zu können.

Der Aufschluß von Zellen in alkalischem Milieu in Gegenwart von Detergenzien, ist technisch zwar einfach, liefert jedoch auch Nukleinsäuren mit großer Länge.

30

An die Rohpräparation der Nukleinsäuren schließen sich Folgereaktionen an. Diese Folgereaktionen erfordern eine bestimmte Qualität der Nukleinsäuren. So muß diese weitestgehend unversehrt sein, die Ausbeute der Präparation muß hoch und reproduzierbar sein. Der Präparationsweg muß einfach und wirtschaftlich sein und die Möglichkeit zur

Automation bieten. Sie muß eine Präparation der Nukleinsäure ohne Gefahr durch Kreuzkontamination anderer Proben ermöglichen, insbesondere wenn enzymatische Amplifikationsreaktionen, wie Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki, R., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H. A. (1988), Science 239, 487 - 491) und Ligase Chain Reaction (LCR) (EP-A-88 311 741.8), Anwendung finden. Daher ist es wünschenswert, die Nukleinsäuren in nicht zu großer Kettenlänge zu erhalten, die Zellen möglichst quantitativ aufzuschließen und im übrigen die oben genannten Nachteile der im Stand der Technik bekannten Aufschlußverfahren zu vermeiden.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem ist somit die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren aus intakten Zellen, insbesondere soll die dabei anfallende Nukleinsäure sich durch nicht zu große Kettenlängen auszeichnen, in wenigen Schritten isolierbar sein und direkt den erforderlichen Folgereaktionen unterworfen werden können.

Dieses technische Problem wird gelöst durch ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch Lysis intakter Zellen und Entfernung der aus den lysierten Zellen getretenen Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Zellen in einer porösen Matrix immobilisiert werden, wobei die Größe der Hohlräume der Matrix in der Größenordnung des zu lysierenden Zelltyps liegt,
- b) die Zellen lysiert werden,
- c) die Nukleinsäuren auf der Matrixoberfläche fixiert werden und danach
- d) eluiert werden.

Die Matrix besteht vorzugsweise aus porösen, anorganischen oder organischen Polymeren, wobei die Oberflächeneigenschaften des die Matrix bildenden Materials dafür sorgen, daß die Zellen reversibel oder irreversibel an der Oberfläche immobilisiert werden. Vorzugsweise beträgt die Größe der Hohlräume des die Matrix bildenden Materials 1 bis 50  $\mu\text{m}$ . Besonders bevorzugt sind Hohlraumgrößen von 5 bis 15  $\mu\text{m}$ . Erreicht werden kann dies in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, wenn die Partikelgröße des die Matrix bildenden Materials 15 bis 25  $\mu\text{m}$  beträgt.

Die in der Matrix immobilisierten Zellen werden vorzugsweise durch physikalische oder chemische Einwirkung lysiert. Dabei kann die Lyse entweder mechanisch wie mit Ultraschall oder durch Scherkräfte, osmotischem Schock oder chemisch mittels Detergenzien oder alkalischem Aufschluß erreicht werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die Oberfläche des die Matrix bildenden Materials Ionenaustauschereigenschaften auf. Insbesondere bei Verwendung von Anionenaustauschern kann dann die aus der lysierten Zelle austretende Nukleinsäure reversibel an die Oberfläche des die Matrix bildenden Materials gebunden werden, um nach verschiedenen Waschoptionen dann durch Einstellen hoher Ionenstärken eluiert zu werden.

Die erfindungsgemäße Verfahrensweise führt zur Präparation von Nukleinsäuren mit hoher Reinheit und erlaubt es, eine qualitativ und quantitativ reproduzierbare Analytik durchzuführen, insbesondere in Kombination mit enzymatischen Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Es hat sich gezeigt, daß milde Aufschlußmethoden mit Detergenzien oder physikalische Aufschlußmethoden, wie Erhitzen einer Probe, die Folgeanwendungen erleichtert. Man erhält bei

Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Beispiel kürzere zelluläre DNA (< 200 kb) beziehungsweise Gesamtnukleinsäuren aus der Zelle. Die Ursachen für eine limitierte Spaltung der Nukleinsäuren sind nicht vollständig bekannt. Die milden Aufschlußmethoden scheinen jedoch zu einer partiellen Degradation der Nukleinsäure zu führen.

Für die reproduzierbare Arbeitsweise ist es vorteilhaft, eine Matrix mit Ionenaustauschereigenschaften zu verwenden, so daß die freigesetzten Nukleinsäuren an dieser Oberfläche haften können und den Zugriff abbauender Enzyme entzogen sind. Es werden dann Nukleinsäuren mit fast idealer Länge für die Folgereaktionen, wie PCR, gewonnen.

Sollen zum Beispiel weiße Säuger-Blutzellen aufgeschlossen werden, müssen zunächst die DNA-freien Erythrozyten entfernt werden. Verschiedene Verfahren dazu sind bekannt, wie zum Beispiel Gradientenzentrifugation oder Extraktion der Zellen mittels oberflächengekoppelter Antikörper (anti-HLA-Magnetobeads). Als besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, die Erythrozyten mittels Dextran zu aggregieren und ohne Zentrifugation abzutrennen. Der Überstand enthält die anderen Blutzellen und weniger als 1/100 der anfänglichen Erythrozytenkonzentration. Die weißen Blutzellen werden dann nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aus der Suspension in die Poren der Matrix überführt. Dies geschieht durch Druckdifferenz oder Zentrifugationskräfte. Es hat sich herausgestellt, daß es nicht genügt, Zellen beispielsweise durch einfache Zentrifugation, durch Ausbildung eines Pellets oder durch eine Filtration über engmaschige Membranen konzentrieren, da dann der erfindungsgemäße Zellaufschluß nicht mehr zuverlässig erfolgt. Dadurch entstehende, relativ dichte Zellverbände mit direktem Zell/Zell-Kontakt können nur unzureichend mit den milden nicht-ionischen Reagenzien

aufgeschlossen werden. Es werden dabei wahrscheinlich nur diejenigen Zellen lysiert, die sich an der Oberfläche eines solchen Zellkonzentrats befinden. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird sichergestellt, daß eine solche Pelletierung nicht einsetzt. Hierbei werden die Zellen durch eine Art Tiefenfiltration in der Matrix konzentriert, d. h. in einem kleinen Volumenelement eingefangen. Das bedeutet, daß Zellen praktisch isoliert in der Matrix hängenbleiben, jedoch nicht übereinander liegen. Erfindungsgemäß erreicht wird dies durch die Verwendung einer porösen Matrix zum Beispiel einem Partikelbett, dessen Zwischenräume in der Größenordnung der Zellgröße liegt. Die Zellen dringen dann bis zu einer bestimmten Tiefe in diese Matrix ein. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen Silicalgelpartikel zum Einsatz mit einer Partikelgröße von vorzugsweise 15 bis 25  $\mu\text{m}$ , so daß Zwischenkornabstände von 1 bis 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 5 bis 15  $\mu\text{m}$ , entstehen. Die durchschnittliche Größe von Erythrozyten beträgt 2  $\mu\text{m}$  von Lymphozyten ungefähr 8  $\mu\text{m}$  und von Monozyten etwa 15  $\mu\text{m}$ .

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden zur Immobilisierung Partikel verwendet, die in einem inerten Netzwerk aus Membranen, vorzugsweise Teflon, eingebettet sind, wobei die Zwischenräume wiederum in etwa der Dimension der zu lysierenden Zellen entsprechen. Dadurch wird gewährleistet, daß sich die Zellen vorzugsweise innerhalb des Netzwerks festsetzen und sich nicht, zum Beispiel wie auf einem Sterilfilter, als dichte Packung in Form eines Filterkuchens absetzen.

Zwischen den Zellen verbleiben enge Kanäle, durch die Lösungen ausgetauscht werden können, wie zum Beispiel das Serum gegen die zell-lysierende Lösung. Da alle Zellen für Reagenzien gut zugänglich sind, können die milden



Lysebedingungen Verwendung finden, ohne daß Ausbeuteverluste zu befürchten sind.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die Partikel Ionenaustauschereigenschaften auf, wie sie beispielsweise in der DE-PS 32 11 305 beschrieben werden. Für die Ausführungsform auf Membranbasis hat sich ein Ionenaustauscher auf Silicagelbasis mit Partikelgrößen  
10 zwischen 15 und 25  $\mu\text{m}$  und Porengrößen von 1500 Å als besonders geeignet erwiesen. Der direkte räumliche Kontakt zu allen lysierenden Zellen gewährleistet, daß die DNA nach der Lyse und partiellen Degradation direkt an der Oberfläche der Festphase fixiert wird und so vor weiterführenden Angriffen der Nukleasen geschützt ist. In  
15 diesem Zustand können die kontaminierenden Bestandteile leicht ausgewaschen werden, gefolgt von der Elution der sauberen Nukleinsäure in einem kleinen Volumen. Man erhält so reproduzierbare Kettenlängen von durchschnittlich 5 bis 20 kb. Weniger als 10% sind kürzer als 5 kb unter  
20 den Aufschlußbedingungen, wie sie in Beispiel 2 beschrieben werden. Dies stellt eine optimale Längenverteilung für eine anschließende enzymatische Nukleinsäureamplifikation dar. Es wurde ebenfalls überraschend festgestellt, daß die gewünschte Größenverteilung bei der Leukozytenpräparation mit Dextran reproduzierbar erreicht wird, während  
25 eine Präparation über Ficoll im Gradienten gewöhnlich zu kürzeren Fragmenten (500 bis 1000 bp) führt.

30 Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren in besonders günstiger Weise mittels der erfindungsgemäß beanspruchten Vorrichtung, die im folgenden beschrieben werden soll, durchgeführt werden kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung besteht aus einem Hohlkörper (4), in dem die die Zellen aufnehmende Matrix (1) zwischen 2 porösen Einrichtungen (2, 3) angeordnet ist. Die Poren-

größe der Einrichtung 2, 3, vorzugsweise Polyethylen- oder Glasfritten, muß dabei größer sein als die Hohlraumgröße des die Matrix 1 bildenden Materials. Vorzugsweise haben die Einrichtungen 2, 3 eine Porengröße von 50 bis 100  $\mu\text{m}$ , wobei die Hohlraumgröße des die Matrix 1 bildenden Materials etwa 1 bis 50  $\mu\text{m}$  beträgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Matrix 1 eine netzartige Membran mit einer Vielzahl von 1 bis 50  $\mu\text{m}$  großen freien Poren, die zusätzlich Ionenaustauscherpartikel aufweist. In den freien Poren werden dann die Zellen immobilisiert, wobei auf den in dieser Matrix befindlichen Ionenaustauscherpartikeln die freigesetzten Nukleinsäuren absorbiert werden.

Eine ebenfalls bevorzugte Ausführungsform stellt eine Vorrichtung dar, bei der das die Matrix 1 bildende Material ein partikelförmiges organisches oder anorganisches Polymeres ist. Vorzugsweise ist das die Matrix 1 bildende Material ein Kieselgel mit Ionenaustauschereigenschaften und einer Partikelgröße von 15 bis 25  $\mu\text{m}$ .

Die Abbildung 1 zeigt ein besonders bevorzugtes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Der Hohlkörper 4 kann zum Beispiel ein handelsübliches Röhrchen (MoBiCol, MoBiTec, Göttingen oder Millipore UFC3 OHW25) sein. Zwischen zwei eng eingepressten Einrichtungen 2, 3, zum Beispiel Polyethylenfritten mit einer Porengröße von 50 bis 100  $\mu\text{m}$ , befindet sich eine Membran mit 5 bis 10  $\mu\text{m}$  großen freien Poren, welche ebenfalls Kieselgel (1500 A Porengröße, 15  $\mu\text{m}$  Partikelgröße) mit Anionenaustauschereigenschaften enthält. Die Membran weist eine Dicke von ca. 1 mm auf. Die Kapazität des Ionenaustauschermaterials ist etwa 15  $\mu\text{g}$  DNA. Durch Übereinanderlegen entsprechender Membranen läßt sich selbstverständlich die Kapazität für DNA erhöhen. Bei geringer mechanische Belastung ist auch ein

randständiges Verschweißen oder Verkleben der Membran denkbar, wodurch die stabilisierende Wirkung der Einrichtungen 2, 3 entfallen kann, so daß die Membran den Hohlkörper 4 ohne die Einrichtungen verschließt.

5

Es ist ebenfalls möglich, mit dem beschriebenen Kieselgel kleine Säulen zu füllen, das zwischen 2 Polyethylen-Fritten mit einer Porengröße von 35  $\mu\text{m}$  angeordnet ist. Vorzugsweise wird die obere Einrichtung 2 mit größeren Poren (70  $\mu\text{m}$ ) gewählt. Die MoBiCol-Säulen werden mit ca. 70 mg Ionenaustauschergel entsprechend 3 mm Füllhöhe beschickt. Bezüglich Plasmid-DNA ergibt sich eine Kapazität von 150  $\mu\text{g}$  DNA.

10

#### 15 Beispiel 1

Zelluläre DNA-Präparation aus Blut:

6 ml Citrat-Blut werden in einem 12 ml PPN-Röhrchen mit 0,12 g Dextran (MW 250.000) homogen versetzt und für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dextran und Erythrozyten bilden Aggregate, die innerhalb 45 min. sedimentieren. Der helle Überstand enthält die Leukozyten annähernd in der natürlichen Zusammensetzung ( $(1 - 5 \times 10^6$  Leukozyten/ml, Erythroz./Leukoz. ca. 2/1. 0,5 ml dieses Überstandes werden auf die Vorrichtung aufgetragen und durch Zentrifugation oder Druck durch den Filter geleitet. Die Zellen werden im Netzwerk zurückgehalten. Nach Durchtritt des Serums wird mit 1 x 0,5 ml Waschlösung (PBS 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM KPi pH 7,4) (phosphate buffered saline) gewaschen.

20

25

30

Danach werden die Zellen mit 125  $\mu\text{l}$  einer 1%igen Lösung eines nicht-ionischen Detergens (NP40; Tween 20) lysiert. Mit 0,5 ml 750 mM KCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol werden die Verunreinigungen ausgewaschen. Die DNA wird entweder mit einem Hochsalzpuffer (1,2 M KCl, 50 mM, MOPS, pH 7,0) (200 mM KOH) oder einem Alkalipuffer eluiert. Der Vorteil des Alkalipuffers besteht darin, daß nach Pufferzusatz zwecks Neutralisation beispielsweise direkt eine

Nukleinsäure zunächst gefällt werden muß. Es besteht jedoch die Gefahr der Schädigung der DNA. In vielen Fällen kann auch ein Aliquot der Hochsalzelution direkt eingesetzt werden, wenn die Nukleinsäurekonzentration die erforderliche Konzentration aufweist.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch Lysis intakter Zellen und Entfernung der aus den lysierten Zellen ausgetretenen Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) die Zellen in einer porösen Matrix immobilisiert werden, wobei die Größe der Hohlräume der Matrix in der Größenordnung des zu lysierenden Zelltyps liegt,
  - b) die Zellen lysiert werden,
  - c) die Nukleinsäuren auf der Matrixoberfläche fixiert werden und danach
  - d) eluiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix ein anorganisches oder organisches Polymeres ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix eine Hohlraumgröße von 1 bis 50  $\mu\text{m}$  aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Hohlräume 5 bis 15  $\mu\text{m}$  groß sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße der Matrix 10 bis 50  $\mu\text{m}$ , insbesondere 15 bis 25  $\mu\text{m}$  beträgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen durch physikalische oder chemische Einwirkungen lysiert werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lyse der Zellen durch Ultraschall, Scherkräfte, Detergenzien, Enzymen, osmotischer Schock etc. oder Kombination davon erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Matrix Ionenaustauschereigenschaften aufweist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren durch einen Puffer mit hoher Ionenstärke oder alkalisch eluiert werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei zwischen den Schritten a)/b) und/oder b)/c) und/oder c)/d) die Matrix gewaschen wird.
11. Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen nach Aufschluß der Zellen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zellenaufnehmende Matrix (1) in einem Hohlkörper (4) zwischen 2 porösen Einrichtungen (2, 3) angeordnet ist, wobei die Porengröße der Einrichtungen (2, 3) größer ist als die Hohlraumgröße des die Matrix (1) bildenden Materials.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße der Einrichtungen (2, 3) 80 bis 100  $\mu\text{m}$  und die Hohlraumgröße des die Matrix (1) bildenden Materials 1 bis 50  $\mu\text{m}$  beträgt.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 und/oder 12, wobei die Matrix (1) eine netzartige Membran ist mit einer Vielzahl von 1 bis 50  $\mu\text{m}$  großen freien Poren, die zusätzlich mit Ionenaustauscherpartikeln versehen ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 11 und/oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß das die Matrix (1) bildende Material ein organisches oder anorganisches Polymeres ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das die Matrix (1) bildende Material Kieselgel mit Ionenaustauschereigenschaften ist und eine Partikelgröße von 15 bis 25  $\mu\text{m}$  aufweist.

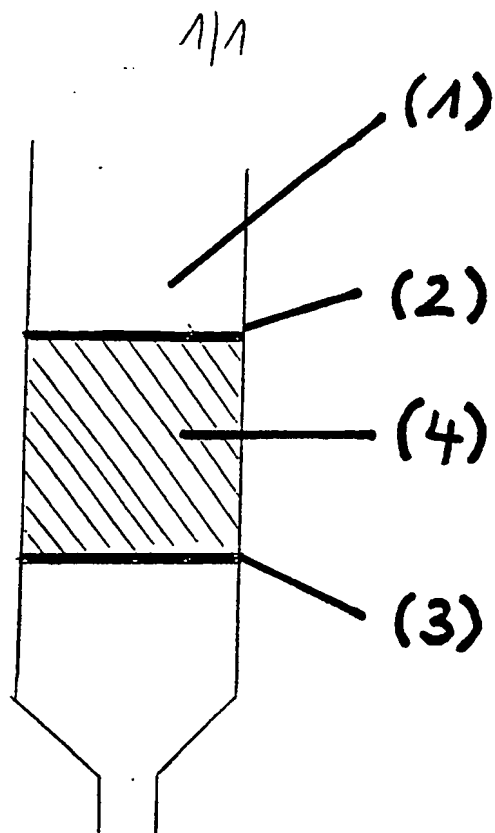


Fig.  
2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/02017

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> C07H 1/08		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup>	C07H 1/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>8</sup>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	EP, A, 0268946 (DIAGEN) 1 June 1988 see the whole document  -----	1,11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
23 January 1992 (23.01.92)		17 March 1992 (17.03.92)
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of Authorized Officer

EP 9102017  
SA 52443

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

FD-302a (Rev. 10-6-95)

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 91/02017

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.5                      C 07 H    1/08		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.5	C 07 H    1/00	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gebörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art. <sup>9</sup>	Kenzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
A	EP,A,0268946 (DIAGEN) 1. Juni 1988, siehe das ganze Dokument -----	1,11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen <sup>10</sup> :</p> <p><b>"A"</b> Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p><b>"E"</b> älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p><b>"L"</b> Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p><b>"O"</b> Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p><b>"P"</b> Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p><b>"T"</b> Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p><b>"X"</b> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p><b>"Y"</b> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p><b>"&amp;"</b> Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23-01-1992		17. 03. 92
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des Bevollmächtigten Beauftragten
EUROPAISCHES PATENTAMT		Natalie Weinberg

EP 9102017  
SA 52443

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

EPO FORM 00473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82